

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KOMPONEN UTAMA  
EKSTRAK BIJI BUAH MERAH (*Pandanus conoideus* Lamk.)**



Disusun oleh :

**DYAH SEPTYANINGSIH**

**M 0304036**

**SKRIPSI**

**Diajukan untuk memenuhi sebagian**

**Persyaratan mendapatkan gelar Sarjana Sains Kimia**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN**

**ALAM**

**UNIVERSITAS SEBELAS MARET**

**SURAKARTA**

**Juli, 2010**

## **BAB I PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang**

Bahan alami dari tumbuhan yang bermanfaat sebagai obat sudah banyak digunakan, baik di bidang industri obat maupun pengobatan tradisional (Pramono, 2002). Salah satu tumbuhan yang saat ini banyak diteliti karena secara empiris banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat lokal Papua adalah buah merah.

Buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) merupakan tumbuhan endemik Papua yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai salah satu sumber fitofarmaka Indonesia. Buah yang termasuk dalam famili Pandanaceae ini oleh masyarakat lokal Papua secara empiris telah dimanfaatkan selain baik sebagai obat tradisional juga sebagai zat pewarna alami dan sumber bahan makanan. Sari buah merah yang diambil dari daging buah telah digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan berbagai penyakit degeneratif, seperti misalnya diabetes mellitus, asam urat, hipertensi, stroke, dan kanker (Budi dan Paimin, 2005). Penduduk lokal Papua sendiri meyakini buah merah dapat mencegah kebutaan, cacangan, penyakit kulit dan meningkatkan stamina.

Penelitian yang dilakukan oleh Budi (2001) menyatakan bahwa sari buah merah yang diambil dari daging buah banyak mengandung senyawa-senyawa antioksidan terutama tokoferol, flavonoid, karotenoid, dan vitamin C sehingga konsumsi buah ini dapat mengurangi resiko kanker. Sari buah merah juga mengandung zat-zat kimia yang dapat meningkatkan daya tahan tubuh seperti asam oleat, asam linoleat, asam linolenat, dekanat, omega 3, dan omega 9 yang semua zat tersebut aktif dalam menangkal terbentuknya radikal bebas dalam tubuh. Kandungan asam lemak dalam sari buah merah sangat tinggi.

Buah merah tersusun atas ribuan biji yang membentuk kulit buah. Biji buah merah terbungkus oleh daging tipis berupa lemak. Biji merupakan alat perkembangbiakan utama dan tempat penyimpanan cadangan makanan

(Tjitrosoepomo, 2005). Hasil fotosintesis, air, dan nitrogen disimpan di dalam lembaga (embrio) untuk menunjang proses perkecambahan. Biji merupakan terminal dari semua proses yang terjadi dalam tumbuhan. Selain menyimpan hasil metabolisme tumbuhan, biji juga mengandung bahan makanan utama misalnya karbohidrat, protein, lipid, dan senyawa metabolit sekunder. Proses pembentukan buah dan biji saling berkaitan erat sehingga dimungkinkan senyawa yang terdapat dalam buah juga terdapat dalam biji. Penelitian *in vivo* dan *in vitro* sari buah merah telah banyak dilakukan tetapi belum ada penelitian dan literatur yang menginformasikan mengenai kandungan kimia biji buah merah.

Selama ini penelitian untuk mengeksplorasi buah merah hanya terfokus pada daging buahnya sedangkan biji buah merah belum diteliti kandungan utamanya. Sejalan dengan penelitian sebelumnya serta berdasarkan adanya keterkaitan erat antara biosintesis biji dan buah tidak menutup kemungkinan bahwa senyawa yang terkandung di dalam daging buah merah juga dapat ditemukan dalam biji buah walaupun berbeda kuantitasnya.

## **B. Perumusan masalah**

### **1. Identifikasi Masalah**

Buah merah tersusun atas ribuan biji yang berderet rapi membentuk kulit buah. Fisiologi tumbuhan mempengaruhi kandungan kimia di dalam tumbuhan tersebut, sehingga masing-masing bagian tumbuhan (daun, batang, kulit buah, daging buah, biji) mempunyai kuantitas kandungan yang berbeda-beda. Selama ini, penelitian untuk mengeksplorasi kandungan kimia buah merah hanya fokus pada daging buahnya karena masyarakat Papua sendiri hanya memanfaatkan sari buah merah yang diambil dari daging buah sebagai obat tradisonal. Sedangkan biji buah merah belum diteliti kandungan senyawanya. Sari buah merah mengandung asam lemak, karotenoid, dan tokoferol. Berdasarkan biosintesis biji dan buah, senyawa yang terkandung dalam daging buah mungkin dapat ditemukan dalam biji buah.

Isolasi senyawa metabolit sekunder dari suatu bahan alam dapat dilakukan dengan berbagai metode ekstraksi yaitu sokhlet, maserasi, dan perkolasi. Senyawa

metabolit sekunder yang terkandung dalam bahan alam dapat larut dalam pelarut yang berbeda sifat kepolarannya. Senyawa yang bersifat polar larut dalam pelarut polar sedangkan senyawa non polar larut dalam pelarut non polar sehingga pelarut yang digunakan akan selektif memisahkan kandungan senyawa tersebut.

Identifikasi kandungan senyawa biji buah merah dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif dengan skrining fitokimia, kromatografi lapis tipis (KLT) dan *gas chromatography-mass spectroscopy* (GC-MS). Sedangkan analisis secara kualitatif dapat dilakukan dengan *high performance liquid chromatography* (HPLC), spektrometer infra merah (IR), spektrometer UV-Vis, dan spektroskopi resonansi magnet inti (NMR).

## 2. Batasan Masalah

Berdasarkan identifikasi masalah tersebut, maka dibuat batasan masalah sebagai berikut:

- a. Buah merah yang digunakan merupakan kultivar berwarna merah yang diperoleh dari daerah Papua. Bagian tumbuhan yang digunakan dalam penelitian adalah biji buahnya.
- b. Isolasi komponen kimia dilakukan dengan ekstraksi sokhlet dengan menggunakan pelarut petroleum eter dan maserasi dengan pelarut etanol.
- c. Identifikasi komponen utama biji buah merah dengan skrining fitokimia dan uji penegasan dengan KLT serta analisis data GC-MS.

## 3. Rumusan Masalah

Berdasarkan identifikasi dan batasan masalah di atas, maka dibuat rumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut :

- a. Golongan senyawa metabolit sekunder ekstrak biji buah merah apa saja yang teridentifikasi dengan skrining fitokimia dan uji penegasan dengan KLT.
- b. Komponen utama biji buah merah apa saja yang teridentifikasi dengan analisis data GC-MS.
- c. Seberapaakah prosentase kandungan total komponen utama dalam biji buah merah.

### **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder ekstrak biji buah merah dengan skrining fitokimia dan uji penegasan dengan KLT.
- b. Mengetahui komponen utama biji buah merah dengan analisis data GC-MS.
- c. Menentukan prosentase kandungan total komponen utama dalam biji buah merah.

### **D. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kandungan kimia biji buah merah dan mengetahui komponen utama biji buah merah. Dengan demikian penelitian ini dapat memberikan sumbangan terhadap eksplorasi manfaat dan khasiat buah merah yang telah dilakukan selama ini.

## **BAB II LANDASAN TEORI**

### **A. Tinjauan Pustaka**

#### **1. Buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.)**

Buah merah (*Pandanus conoideus* Lamk.) atau oleh masyarakat Wamena, Papua, dikenal dengan nama *Kuansu*, merupakan tumbuhan asli Papua yang banyak terdapat di daerah pegunungan Jayawijaya (Wamena dan Tolikara), Manokwari, Jayapura, Timika, Nabire, dan Sorong. Buah merah dapat tumbuh di daerah dengan curah hujan 186 mm per bulan dengan suhu di bawah 17 derajat Celcius dan intensitas sinar matahari sekitar 57%. Biasanya buah merah tumbuh bergerombol dalam satu area. (Kennedy and Clarke, 2004).

Buah merah termasuk tumbuhan endemik yang tumbuh di wilayah Papua, Papua New Guinea, dan Maluku. (Bourke, 2005). Sekarang, buah merah sudah mulai dibudidayakan. Beberapa sentra tumbuhan buah merah antara lain Puncak

Jaya, Timika, Tolikara, Sami, Manokwari, Jayawijaya, dan Yahukimo. (Budi dan Paimin, 2005). Musim berbuah berhubungan dengan ketinggian tempat tumbuh. Di daerah pantai masa buah sepanjang tahun, makin tinggi tempat tumbuh makin pendek masa berbuah. Masa berbuah sekitar 4 bulan, biasanya Januari sampai April. (Bourke, 2005).

a. Klasifikasi tanaman

Klasifikasi buah merah :

Divisi : *Spermatophyta*  
Kelas : *Angiospermae*  
Subkelas : *Monocotyledonae*  
Ordo : *Pandanales*  
Famili : *Pandanaceae*  
Genus : *Pandanus*

(Budi,2005)

b. Deskripsi tanaman

5

Tumbuhan buah merah berbentuk semak, perdu, atau pohon. Tinggi tanaman dapat mencapai 16 m dengan tinggi batang bebas cabang sendiri setinggi 5 sampai 8 m yang diperkokoh akar-akar tunjang pada batang sebelah bawah. Kultivar buah berbentuk lonjong dengan kuncup tertutup daun buah. (Budi, 2005). Buah Merah sendiri panjang buahnya mencapai 96-102 cm dengan diameter 15-20 cm. Bobot buah mencapai 7-8 kg. Warna buah merah bata saat muda dan merah terang setelah matang. Buah dibungkus daun pelindung berbentuk melancip dengan duri pada tulang utama sepanjang 8/10 bagian dari ujung. Kultivar merah pendek memiliki buah berbentuk pendek silindris, ujung tumpul, dan pangkal menjantung. (Budi, 2005).

Buah merah tersusun dari ribuan biji yang berbaris rapi membentuk kulit buah. Biji kecil memanjang sepanjang 9-13 mm dengan bagian atas meruncing. Bagian pangkal biji menempel pada bagian jantung, sedangkan ujungnya

membentuk totol-totol di bagian kulit buah. Biji berwarna hitam kecokelatan dibungkus daging tipis berupa lemak. Warna daging kuning, cokelat, atau merah bata. (Budi dan Paimin, 2005). Biji buah merah jarang dapat berkecambah, sehingga pada umumnya perbanyakan tumbuhan dilakukan dengan stek batang, akar, dan pucuk. (Kennedy dan Clarke, 2004; Bourke, 2005).



Gambar 1. Buah Merah (*P. conoideus* Lamk.)

c. Manfaat buah merah

Sejak diperkenalkan oleh I Made Budi, sari buah merah ditekankan untuk pengobatan alternatif penyakit tumor/kanker, HIV/AIDS, diabetes, stroke, jantung, hipertensi, hepatitis, asam urat, dan rematik. (Subroto, 2007). Penduduk Papua sendiri sejak lama meyakini bahwa dengan mengonsumsi buah merah dapat mencegah kebutaan dan dapat meningkatkan stamina tubuh. Selain itu, buah merah juga dimanfaatkan masyarakat Papua sebagai bahan pangan, pewarna, bahan kerajinan, dan sering digunakan dalam upacara adat.

d. Kandungan kimia buah merah

Buah merah mengandung zat-zat alami yang dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan proses metabolisme. Menurut Pohan *et al.* (2006) komponen senyawa buah merah meliputi karotenoid, betakaroten, tokoferol, alfa tokoferol, dan *fatty acid* yang berperan sebagai senyawa anti radikal bebas pengendali

beragam penyakit seperti kanker, hipertensi, paru-paru dan infeksi. Kandungan antioksidan terutama  $\beta$  karoten dan  $\alpha$  tokoferol dalam buah merah lebih tinggi dibandingkan buah dan sayuran lainnya, seperti tomat, wortel, papaya, taoge. Kandungan utama sari buah merah adalah asam lemak. Asam lemak yang terdapat dalam sari buah merah terdiri atas; asam palmitat, asam oleat, asam linoleat, dan asam linolenat. Kandungan asam lemak paling tinggi adalah asam oleat yaitu antara 40,9%, asam linoleat 5,20%, dan asam palmitoleat 0,78%. Sedangkan asam lemak jenuh didominasi oleh asam palmitat 15,90% dan asam dekanat sekitar 2%. (Pohan, 2005).

Selain itu, buah merah mengandung banyak kalori untuk menambah energi, kalsium, serat, protein, vitamin B1, vitamin C. Kandungan kalornya tinggi, mencapai 400 kilo kalori /100 gram daging buah. Tak heran jika setelah meminumnya orang akan merasa bugar dan nafsu makan meningkat.

## 2. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan komponen yang diinginkan dari penyusun-penyusun lain dalam suatu campuran berdasarkan kelarutan komponen tersebut terhadap pelarut yang digunakan. Pemilihan metode ekstraksi yang tepat tergantung dari tekstur, kandungan air, bahan tumbuhan yang akan diekstraksi dan jenis senyawa yang akan diisolasi. (Padmawinata, 1996). Ekstraksi biasanya menggunakan pelarut organik secara berurutan dengan kepolaran yang semakin meningkat. Kepolaran pelarut tergantung dari nilai konstanta dielektriknya. Nilai konstanta dielektrik beberapa pelarut dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Nilai konstanta dielektrik beberapa pelarut

Pelarut	$\epsilon^0$
<i>n</i> - Heksana	0.00
Benzene	+ 0.025
Dietil eter	+ 0.29
Kloroform	+ 0.31
Aseton	+ 0.43



Etil asetat	+ 0.45
Asetonitril	+ 0.50
Etanol	+ 0.68
Metanol	+ 0.73

Sumber : Stahl, 1985

Metode ekstraksi yang biasa digunakan antara lain :

#### 1. Sokhlet

Sokhlet merupakan proses pemisahan berulang dengan sampel berupa padatan. Sampel yang akan diekstrak biasanya padatan yang telah dihaluskan. Padatan ini lalu dibungkus dengan kertas saring lalu dimasukkan dalam alat sokhlet. Alat ini pada bagian atas dihubungkan dengan pendingin balik sedangkan bagian bawah terdapat labu alas bulat sebagai tempat pelarut. Pemanasan dengan suhu tertentu akan menguapkan pelarut. Uap akan naik ke atas mengalami proses pendinginan. Ruang sokhlet akan dipenuhi oleh pelarut yang telah mengembun hingga batas tertentu pelarut tersebut akan membawa solut dalam labu. Proses ini berlangsung terus menerus. (Rusdi, 1990). Keuntungan metode ini adalah ekstraksi berlangsung cepat, cairan pengestraksi yang dibutuhkan sedikit, dan cairan pengestraksi tidak pernah mengalami kejenuhan.

#### 2. Maserasi

Maserasi merupakan cara ekstraksi paling sederhana yang dilakukan dengan merendam serbuk kasar simplisia dengan cairan pengestraksi selama 4-10 hari dan disimpan terlindung dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna). Keuntungan dari maserasi adalah hasil ekstraksi banyak serta dapat menghindari perubahan kimia terhadap senyawa-senyawa tertentu oleh karena pemanasan namun demikian proses maserasi membutuhkan waktu yang relatif lama. Kerugian cara maserasi adalah penyarian kurang sempurna karena terjadi kejenuhan cairan penyari dan membutuhkan waktu yang lama. (Hargono, 1997). Walaupun demikian, maserasi merupakan proses

ekstraksi yang masih umum digunakan karena cara pengerjaan dan peralatannya sederhana dan mudah.

### 3. Skrining fitokimia

Pendekatan skrining fitokimia meliputi analisis kualitatif kandungan kimia dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, buah, bunga, biji), terutama kandungan metabolit sekunder yang bioaktif, yaitu alkaloid, antrakinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin (steroid dan triterpenoid), tanin (polifenolat), minyak atsiri (terpenoid), dan sebagainya. Adapun tujuan pendekatan skrining fitokimia adalah mengetahui kandungan bioaktif atau kandungan yang berguna untuk pengobatan dalam tumbuhan. (Farnsworth, 1966).

Metode yang digunakan atau dipilih untuk melakukan skrining fitokimia harus memenuhi beberapa persyaratan antara lain sederhana, cepat, dapat dilakukan dengan peralatan minimal, bersifat semikuantitatif yaitu memiliki batas kepekaan untuk senyawa yang bersangkutan, selektif terhadap golongan senyawa yang dipelajari, dan dapat memberikan keterangan tambahan ada atau tidaknya senyawa tertentu dalam dari golongan senyawa yang dipelajari.

Analisis kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa dapat dilakukan dengan uji tabung dan atau dengan uji penegasan KLT. (Stahl, 1985). Uji tabung dilakukan terhadap golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Misalnya, sari dalam petroleum eter mengandung zat-zat kimia yang larut dalam minyak (lemak dan asam lemak tinggi, steroid, terpenoid dan karotenoid). Sari dalam eter mengandung senyawa alkaloid, senyawa-senyawa fenolik (fenol-fenol, asam fenolat, fenil propanoid, flavonoid, antrakinon), komponen minyak atsiri tertentu, dan asam lemak. Sedangkan sari etanol-air mengandung zat-zat kimia seperti garam alkaloid, antosian, glikosida, saponin, tanin, dan flavonoid. Uji penegasan dengan KLT hanya dilakukan terhadap senyawa yang memberikan hasil positif pada uji tabung.

### 4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi cair-padat dan merupakan metode pemisahan fisikokimia. Lapisan yang memisahkan, yang terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. (Sastrohamidjojo, 1973). Fase diam tersebut dapat berupa lapisan tipis alumina, silika gel atau bahan serbuk lainnya.

Campuran yang akan dipisah berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita. Setelah pelat ditempatkan dalam larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan yang terjadi adalah adsorpsi. Kekuatan adsorpsi tergantung pada kuat lemahnya interaksi antara senyawa, pelarut, dan adsorben. (Padmawinata, 1991). Fase gerak untuk KLT terdiri dari campuran dua atau tiga sistem pelarut yang berbeda kepolarannya. Sistem fase gerak yang biasa digunakan antara lain, n-heksana/etil asetat, eter/n-heksana, diklorometan/n-heksana, diklorometan/metanol. (Still, 1978).

Pemisahan dengan KLT dengan mudah diamati jika semua senyawa yang dipisahkan berwarna. Namun, jika beberapa atau semua senyawa tidak berwarna harus dilakukan penampakan bercak. Bercak yang terbentuk berdasarkan hasil pengembangan diamati dibawah sinar tampak dan sinar UV. Jika senyawa yang diteliti mengandung ikatan rangkap terkonjugasi atau cincin aromatik, bercak akan tampak gelap dengan latar belakang bersinar pada UV 254 nm. Pada UV 365 nm, bercak yang sama akan nampak berpendar. Jika pengamatan di bawah sinar UV tidak dapat mendeteksi suatu senyawa, perlu dilakukan pengujian reaksi dengan penyemprotan atau penguapan suatu reagen. Pengujian berdasarkan warna dilakukan untuk uji kualitatif. KLT sering digunakan untuk mencari sistem eluen untuk pemisahan campuran senyawa dengan kromatografi kolom.

Identifikasi dari senyawa yang terpisah pada lapis tipis diperoleh dari harga faktor retensi ( $R_f$ ), yaitu dengan membandingkan jarak yang ditempuh oleh senyawa terlarut dengan jarak tempuh pelarut.

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut dari titik asal}}$$

(Padmawinata, 1985).

Kelebihan KLT adalah dapat melakukan pemisahan senyawa yang sangat berbeda seperti senyawa organik alam dan organik sintetis, kompleks anorganik-organik, dan bahkan ion anorganik dapat dilakukan dalam beberapa menit dengan alat yang harganya tidak terlalu mahal. Selain itu, KLT hanya memerlukan pelarut dan cuplikan dalam jumlah sedikit (beberapa mikrogram sampai lima gram).

#### 5. Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Kromatografi cair vakum merupakan salah satu kromatografi vakum khusus yang biasanya menggunakan silika gel sebagai adsorben. Kelebihan KCV jika dibandingkan dengan kromatografi kolom biasa terletak pada kecepatan proses (efisiensi waktu) karena proses pengelusan dipercepat dengan memvakumkan kolom selain itu KCV juga dapat memisahkan sampel dalam jumlah banyak.

Pemilihan jenis silika gel yang tepat merupakan faktor yang sangat penting untuk mendapatkan hasil pemisahan yang baik. Ukuran partikel silika gel yang terlalu kecil akan menyebabkan proses elusi berjalan sangat lambat. (Peddersen, 2001).

Pemilihan sistem pelarut untuk kromatografi kolom vakum cair dapat dilakukan dengan 3 pendekatan, yaitu: penelusuran pustaka, mencoba menerapkan data KLT pada pemisahan dengan kolom, dan pemakaian elusi landaian umum dari pelarut non polar yang tidak menggerakkan zat terlarut sampai pelarut polar yang menggerakkan zat terlarut (Padmawinata, 1991). Sistem elusi dapat dilakukan dengan metode gradien pelarut atau dengan sistem isokratik. Elusi gradient (variasi kepolaran pelarut) dilakukan jika campuran senyawa cukup kompleks sedangkan elusi isokratik dilakukan jika campuran senyawa yang akan dipisahkan sederhana.

Sampel dilarutkan dalam pelarut yang sesuai atau sampel dibuat serbuk bersama adsorben (impregnasi) dan dimasukkan ke bagian atas kolom kemudian dihisap perlahan-lahan. Kolom selanjutnya dielusi dengan pelarut yang sesuai, dimulai dengan yang paling non polar. Kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi. Pada kromatografi cair vakum, fraksi-fraksi yang ditampung

biasanya bervolume jauh lebih besar dibandingkan dengan fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom biasa. Langkah pemisahan menggunakan kromatografi cair vakum biasanya dilakukan pada tahap awal pemisahan (pemisahan terhadap ekstrak kasar yang diperoleh langsung dari proses ekstraksi).

#### 6. Gas Chromatography – Mass Spectroscopy (GC-MS)

GC-MS merupakan suatu gabungan dari instrumen GC dan instrumen MS. Ke dua alat dihubungkan dengan satu interfase. Kromatografi gas berfungsi sebagai alat pemisah berbagai komponen campuran dalam sampel sedangkan spektrometer massa berfungsi untuk mendeteksi masing-masing molekul komponen yang telah dipisahkan pada sistem kromatografi gas. (McNair, 1988).

GC-MS dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Analisis kromatogram GC-MS memberikan informasi jumlah komponen senyawa yang terpisah. Luas puncak kromatogram merepresentasikan konsentrasi (%) senyawa reaktif terhadap cuplikan yang menguap pada kondisi pengoperasian GC-MS. Identifikasi senyawa dilakukan dengan membandingkan pola fragmentasi spektra massa hasil GC-MS dengan pola fragmentasi senyawa referensi standar.

Dalam GC-MS, cuplikan diinjeksikan ke dalam injektor. Aliran gas dari gas pengangkut akan membawa cuplikan yang telah teruapkan masuk ke dalam kolom. Kolom akan memisahkan komponen-komponen dari cuplikan. (McNair, 1988). Komponen-komponen yang telah terpisah kemudian akan ditembak dengan elektron sehingga akan terfragmentasi menjadi ion-ion positif dengan perbandingan massa dan muatan ( $m/z$ ) tertentu.

Instrumen GC-MS terdiri dari Gas pengangkut (*gas carrier*), pengatur aliran dan pengatur tekanan, tempat injeksi, kolom, dan detektor. Gas pengangkut yang digunakan dalam GC-MS harus memiliki persyaratan khusus diantaranya adalah ; inert (tidak bereaksi dengan sampel, pelarut, dan material kolom), dan dapat mengurangi difusi gas. (Sastrohamidjojo, 2005). Suatu pengatur aliran dan pengatur tekanan diperlukan untuk mengalirkan uap sampel ke dalam kolom GC-MS dengan kecepatan dan tekanan yang sesuai. Dalam pemisahan dengan GC-MS, sampel harus dalam bentuk gas. Teknik injeksi yang digunakan tergantung

pada jenis sampel. Jenis-jenis teknik injeksi pada GC-MS antara lain *split*, *split less*, *on column*, dan *wet needle*. Pemilihan jenis teknik injeksi yang akan digunakan tergantung pada sifat sampel dan banyaknya sampel. Keberhasilan atau kegagalan analisis GC-MS tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi kerja yang tepat. Jika jumlah sampel yang akan dipisahkan besar maka digunakan *packed column* sedangkan untuk sampel dalam jumlah sedikit digunakan *capillary column*.

Pada detektor komponen-komponen cuplikan yang telah terpisah dideteksi. Detektor yang baik memiliki sensitivitas tinggi, memiliki respon linier yang lebar, bersifat nondestruktif, dan memiliki respon yang sama terhadap semua jenis senyawa. Saat ini ada tiga jenis detektor yang dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa organik yaitu *Flame Ionization Detector* (FID), *Thermal Conductivity Detector* (TCD), dan *Mass Spectroscopy* (MS).

## B. Kerangka Pemikiran

Sari buah merah yang diambil dari daging buahnya telah banyak diteliti dan telah diketahui banyak mengandung senyawa-senyawa antioksidan dan senyawa-senyawa yang dapat meningkatkan daya tahan tubuh sedangkan biji buahnya belum pernah diteliti sebelumnya dan belum ditemukan literatur yang menginformasikan mengenai komponen senyawa yang terkandung di dalam biji buah merah. Berdasarkan biosintesis biji, daging buah memiliki keterkaitan yang erat dengan fungsi biji sebagai penyimpan cadangan makanan. Pada saat biji masak, cadangan makanan yang tersimpan dalam daging buah akan dipindahkan ke dalam embrio untuk menunjang perkecambahan. Sehingga dimungkinkan kandungan senyawa yang terdapat dalam daging buah juga dapat ditemukan dalam biji buah walaupun dengan kuantitas yang berbeda. Isolasi dan identifikasi komponen senyawa yang terkandung dalam biji buah merah dilakukan untuk lebih mengeksplorasi potensi buah merah secara menyeluruh.

Senyawa metabolit sekunder larut dalam pelarut yang berbeda berdasarkan sifat kepolaran senyawa. Senyawa polar larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa non polar larut dalam pelarut non polar. Proses isolasi dilakukan dengan ekstraksi sokhlet dengan petroleum eter untuk mengisolasi senyawa-senyawa non polar. Dipilih sokhlet karena mampu mengekstrak secara berulang-ulang dengan volume pengekstrak yang tidak terlalu banyak dan kebutuhan pemanasan minimal. Residu dimaserasi dengan menggunakan etanol untuk mengisolasi senyawa yang lebih polar.

Identifikasi awal dilakukan dengan skrining fitokimia (uji tabung dan uji penegasan dengan KLT) untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder apa saja yang berhasil diisolasi dari biji buah merah. Dari hasil uji penegasan dengan KLT kita dapat menentukan senyawa yang banyak terkandung dalam ekstrak petroleum eter dan ekstrak etanol. Menurut Budi (2005), komponen utama sari buah merah adalah asam lemak maka tidak menutup kemungkinan komponen utama dari biji buah merah juga asam lemak. Asam lemak merupakan senyawa yang larut dalam pelarut non polar.

Pemisahan komponen utama biji buah merah dari komponen senyawa lainnya dapat dilakukan dengan kromatografi kolom. Kompleksitas campuran senyawa yang akan dipisahkan mempengaruhi pemilihan jenis kromatografi kolom yang akan digunakan. KCV dapat digunakan untuk pemisahan campuran senyawa yang sederhana (setidaknya terdiri dari 2 komponen senyawa). Sistem pelarut yang akan digunakan dalam kromatografi kolom ditentukan terlebih dulu dengan KLT. Fraksi yang mengandung komponen utama kemudian diidentifikasi dengan GC-MS. Analisis luas puncak kromatogram GC-MS menunjukkan konsentrasi relatif (%) komponen senyawa sedangkan jumlah puncak kromatogram menunjukkan jumlah komponen senyawa. Identifikasi senyawa dengan membandingkan pola fragmentasi spektra massa senyawa dengan pola fragmentasi senyawa referensi.

### C. Hipotesis

Berdasarkan kerangka pemikiran di atas dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut :

1. Golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam biji buah merah hampir sama dengan daging buahnya.
2. Komponen utama biji buah merah adalah asam lemak.
3. Kandungan total asam lemak dalam biji buah merah lebih tinggi jika dibandingkan dengan sari buah merah yang diambil dari daging buahnya.

### **BAB III**

#### **METODOLOGI PENELITIAN**

##### **A. Metode Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental di laboratorium. Isolasi senyawa-senyawa non polar biji buah merah dilakukan dengan ekstraksi sokhlet dengan pelarut petroleum eter. Residu dimaserasi dengan etanol untuk mengisolasi senyawa-senyawa yang lebih polar. Identifikasi awal golongan senyawa dalam ekstrak petroleum eter dan ekstrak etanol dilakukan dengan metode skrining fitokimia dan uji penegasan dengan KLT. Fraksinasi ekstrak petroleum eter dilakukan dengan KCV. Kemudian fraksi yang dominan dari ekstrak petroleum eter diidentifikasi menggunakan GC-MS.

##### **B. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2008 – Mei 2009 di Laboratorium Kimia Dasar FMIPA dan SubLab Kimia Laboratorium Pusat Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta. Sedangkan analisis GC-MS dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.



## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan sebagai berikut :

1. Satu set alat Sokhlet
2. Satu set alat *vacuum rotary evaporator*
3. GC-MS Shimadzu QP20105
4. Penyaring *Buchner*
5. *TLC Chamber*
6. Lampu UV 254 nm dan 365 nm
7. Mikropipet
8. Satu set alat Kromatografi Cair Vakum (KCV)
9. *Hot Plate*

16

### 2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- |   |  |
|---|--|
| 1. Biji Buah merah                            | 14. Dietil eter p.a (Merck)                  |
| 2. PE p.a (Merck)                             | 15. HCl p.a (Merck)                          |
| 3. Akuades                                    | 16. Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhidrat |
| 4. Silika Gel 60 <i>for Column</i> (Merck)    | 17. KOH (Merck)                              |
| 5. Etanol p.a (Merck)                         | 18. SbCl <sub>3</sub>                        |
| 6. Aseton p.a (Merck)                         | 19. Rhodamin B                               |
| 7. <i>n</i> - Heksana p.a (Merck)             | 20. Kloroform p.a (Merck)                    |
| 8. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> p.a (Merck) | 21. NaOH p.a (Merck)                         |
| 9. Logam Mg                                   | 22. Kertas saring biasa                      |
| 10. FeCl <sub>3</sub> (Merck)                 | 23. Kertas saring whatman 42                 |
| 11. Etil asetat p.a (Merck)                   | 24. Kertas lakmus                            |
| 12. Kalium heksasianoferrat (III)             | 25. Plat KLT GF 254                          |
| 13. Asam asetat anhidrat p.a (Merck)          | 26. Toluena p.a (Merck)                      |

## D. Prosedur Penelitian

### 1. Pembuatan Serbuk Biji Buah Merah

Biji buah merah dipisahkan dari empulurnya kemudian dicuci dengan air dan aseton. Biji buah merah kemudian dikeringkan dengan oven pada temperatur 50°C selama  $\pm$  12 jam hingga diperoleh berat konstan. Biji buah merah yang telah kering digiling sampai berbentuk serbuk.

## 2. Ekstraksi Biji Buah Merah

Sebanyak 45 g serbuk biji buah merah diekstraksi sokhlet dengan 450 ml petroleum eter selama 7 jam dengan kisaran suhu 40-60 °C. Residu dikeringkan kemudian dimaserasi dengan  $\pm$  400 ml etanol selama 7 hari dan diaduk setiap hari. Masing-masing ekstrak petroleum eter dan ekstrak etanol diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C.

## 3. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap masing-masing ekstrak pekat PE dan etanol untuk mengetahui golongan senyawa yang terisolasi.

### a. Ekstrak Petroleum Eter

Skrining fitokimia (uji tabung) terhadap ekstrak PE, sebagai berikut ;

#### 1. Lemak dan Asam Lemak

5 ml ekstrak petroleum eter diuapkan sampai kering kemudian ditambah 5 ml larutan KOH 0,5 N dalam etanol, kemudian direfluks sehingga tidak terlihat tetesan minyak pada permukaan cairan, etanol dihilangkan dengan cara dipanaskan dalam suhu 80 °C. Sisa dilarutkan dalam air panas dan diekstraksi dengan eter 2x10 ml. Fraksi eter digunakan untuk identifikasi steroid, triterpenoid, dan karotenoid. Fraksi air diasamkan dengan HCl dan diekstraksi lagi dengan eter. Ekstrak eter diuapkan jika sisa berminyak maka ekstrak eter tersebut mengandung asam lemak.

#### 2. Steroid dan Triterpenoid

Lebih kurang 5 ml ekstrak eter diuapkan hingga kering dan dilarutkan dalam 0,5 ml anhidrid asam asetat. Ditambahkan 0,5 ml kloroform kemudian diuapkan. Ke dalam larutan ditambahkan 2-3 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (reaksi *Lieberman-Burchard*).

### 3. Karotenoid

Lebih kurang 5 ml ekstrak eter diuapkan hingga kering kemudian ditambah 2-3 tetes jenuh  $\text{SbCl}_3$  dalam kloroform.

#### b. Ekstrak Etanol

Skrining fitokimia (uji tabung) terhadap ekstrak etanol, sebagai berikut ;

##### 1. Glikosida

Lebih kurang 20 ml ekstrak etanol ditambahkan 15 ml HCl 10%, kemudian direfluks selama 30 menit. Larutan didinginkan kemudian diekstrak 3x8 ml eter dengan corong pisah. Lapisan eter dipisahkan dan ditambah dengan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat.

##### a. Senyawa fenolik

Lebih kurang 1 ml ekstrak eter diuapkan kemudian ditetesi dengan kalium heksasianoferrat (III) dan larutan  $\text{FeCl}_3$ .

##### b. Flavonoid

Lebih kurang 3 ml ekstrak eter diuapkan. Sisa dilarutkan dalam 1-2 ml metanol 50%. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan logam Mg dan 4 tetes HCl pekat.

##### c. Antrakuinon

Lebih kurang 3 ml ekstrak eter ditambahkan NaOH 10% kemudian dikocok.

##### d. Asam Lemak

Lebih kurang 5 ml ekstrak eter diuapkan. Jika sisa berminyak maka dalam sari eter tersebut mengandung asam lemak.

##### 2. Saponin

Lebih kurang 2 ml ekstrak etanol diuapkan kemudian diencerkan dengan aquades. Dikocok selama 15 menit menggunakan *Vortex*.

##### 3. Tanin

Lebih kurang 1 ml ekstrak etanol diencerkan dengan 2 ml aquades. Ditambahkan 3 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$ .

#### 4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT digunakan untuk uji penegasan skrining fitokimia dan untuk mencari sistem eluen yang sesuai dalam penyederhaan jumlah komponen dalam ekstrak.

##### a. Uji Penegasan Skrining fitokimia dengan KLT

Uji penegasan skrining fitokimia dengan menggunakan KLT hanya dilakukan terhadap golongan senyawa yang memberikan hasil positif pada uji tabung. Sistem KLT untuk masing-masing golongan senyawa dalam ekstrak PE dapat dilihat pada Tabel 2. Sistem KLT yang digunakan untuk uji penegasan masing-masing kandungan senyawa berbeda. Rhodamin B merupakan penampak bercak yang dapat mendeteksi semua jenis asam lemak. (Harborne, 1997). Reagen Liberman-burchard merupakan pereaksi yang spesifik untuk mendeteksi senyawa golongan streoid dan triterpenoid. (Kristanti, 2008).

Tabel 2. Sistem KLT untuk Uji Penegasan Skrining Fitokimia dalam Ekstrak Petroleum Eter.

Sistem KLT	Asam lemak dan Lemak	Karotenoid	Steroid dan triterpenoid
Fase diam	Silika gel GF <sub>254</sub>	Silika gel GF <sub>254</sub>	Silika gel GF <sub>254</sub>
Fase gerak	Benzene : Dietil eter (19:1)	Dietil eter : Benzene ( 1 : 1)	n-Heksana : Etil asetat ( 1 : 1)
Deteksi	0,5% Rhodamin B dalam etanol	SbCl <sub>3</sub> dalam kloroform	<i>Lieberman Burchard</i>
Keterangan	Bercak ungu pada latar merah muda pada 365 nm	Di bawah sinar UV 365 nm dan 254 nm	Di bawah sinar UV 365 nm dan 254 nm

( Sumber : Depkes, 1979)

Sistem KLT untuk senyawa-senyawa dalam etanol dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Sistem KLT untuk Uji Penegasan Skrining Fitokimia dalam Ekstrak Etanol

Sistem KLT	Antrakuinon	Tanin dan senyawa Fenolik
Fase diam	Silika gel GF <sub>254</sub>	Silika gel GF <sub>254</sub>

Fase gerak	Etil asetat : Metanol : air ( 100 : 13,5 : 10)	Etil asetat : Metanol : air ( 100 : 13,5 : 10)
Deteksi	KOH 5 % etanolik	FeCl <sub>3</sub>
Keterangan	Di bawah sinar tampak berwarna merah jingga	Dilihat di bawah sinar tampak senyawa fenolik berwarna biru kehitaman

( Sumber : Depkes, 1979)

b. Penentuan Sistem Eluen dengan KLT

Sistem eluen yang akan digunakan dalam KCV (Kromatografi Cair Vakum) ditentukan terlebih dahulu dengan KLT. Pelarut yang digunakan adalah n-heksana-etil asetat.

Ekstrak PE ditotolkan pada plat KLT dan dielusikan dalam larutan pengembang *n*-heksana : etil asetat (1:1 ; 10:9 ; 10:8 ; 10:7 ; 10:6 ; 10:5 ; 10:4; 10:3; 10:2 ; 10:1 ). Deteksi bercak diamati dalam lampu UV 254 nm dan 365 nm. Sistem eluen terpilih yaitu yang memberikan profil pemisahan paling baik dan memberikan spot paling banyak kemudian digunakan sebagai fase gerak dalam kromatografi cair vakum.

### 5. Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Sebanyak 1 g ekstrak PE ditambahkan ke dalam 3 g silika gel 60 dan dipanaskan dalam *waterbath* hingga pelarut menguap.

Persiapan kolom KCV dilakukan secara *packing* kering. Sebanyak 30 g silika gel 60 dimasukkan ke dalam kolom dalam keadaan kering tidak dicampur terlebih dahulu dengan solven di luar kolom. Kolom kemudian divakum. Selanjutnya silika gel 60 yang terlapis ekstrak dimasukkan ke dalam kolom dan kolom divakum. Di atas lapisan silika gel yang tersalut ekstrak kemudian diletakkan kertas saring.

Proses elusi dimulai dari pelarut yang non polar hingga pelarut yang polar. Eluen untuk KCV ditentukan sebelumnya dengan KLT. Setiap pengelusian, kolom divakum. Masing-masing fraksi dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya

dengan cara diangin-anginkan. Masing-masing fraksi ditimbang untuk mengetahui beratnya. Fraksi yang secara kuantitatif paling banyak diidentifikasi dengan GC-MS.

#### 6. Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS)

Kondisi operasi alat GC-MS ditunjukkan pada Lampiran 1.

### **E. Teknik Pengumpulan Data**

Data yang diperoleh dari hasil penelitian yaitu golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak PE dan ekstrak etanol dari hasil skrining fitokimia. Uji penegasan dengan KLT diperoleh harga  $R_f$  dan warna spot yang menegaskan adanya golongan senyawa tertentu dalam ekstrak PE dan ekstrak etanol. Identifikasi dengan GC-MS digunakan untuk memperkirakan komponen utama biji buah merah. Dari kromatogram GC-MS diperoleh jumlah komponen senyawa dan % konsentrasi relatif masing-masing komponen dalam sampel. Prosentase area relatif masing-masing komponen digunakan untuk menghitung kandungan masing-masing komponen senyawa dalam biji buah merah. Pola fragmentasi spektra massa instrumen GC-MS dibandingkan dengan spektra massa senyawa *reference* dari penelusuran *library* untuk mengidentifikasi komponen senyawa.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Persiapan Sampel Biji Buah Merah**

Pengeringan dan penyerbukan 180 g biji buah merah menghasilkan 173 g serbuk kering berwarna coklat kehitaman. Pengeringan dilakukan pada suhu 50 °C dengan menggunakan oven hingga diperoleh berat konstan. Prosedur ini dapat menghilangkan air dengan baik sehingga sampel tidak mudah rusak dalam jangka waktu yang lama. Bahan simplisia dapat dikeringkan pada suhu 30-90 °C, tetapi

suhu yang terbaik adalah tidak melebihi 60 °C. (Sirait, 1985). Selanjutnya biji buah merah kering digiling sampai berbentuk serbuk untuk memperluas permukaan yang akan berinteraksi dengan pelarut pada proses ekstraksi sehingga lebih banyak senyawa yang terekstrak. Serbuk biji buah merah kemudian diekstraksi untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya.

### **B. Ekstraksi Sampel Biji Buah Merah**

Ekstraksi sokhlet 45 g serbuk biji buah merah dengan 450 mL petroleum eter menghasilkan ekstrak berwarna coklat kemerahan. Ekstraksi sokhlet dengan menggunakan petroleum eter dilakukan untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder yang bersifat non polar. Sokhlet merupakan cara ekstraksi yang biasa digunakan untuk menarik minyak dari biji dan buah. Ekstrak petroleum eter yang terkumpul dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut. Ekstrak pekat yang dihasilkan berupa cairan kental berwarna coklat kemerahan dengan endapan putih sebanyak 6,576 g dengan rendemen 14,61%.

Residu dari proses ekstraksi sokhlet dikeringkan untuk menguapkan sisa pelarut dan dimaserasi dengan etanol selama 7 hari disertai dengan pengadukan. Etanol merupakan pelarut polar sehingga dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar atau senyawa metabolit sekunder yang tidak ikut terekstrak oleh petroleum eter. Pengadukan bertujuan untuk membantu mempercepat proses distribusi solven ke dalam jaringan tanaman sehingga senyawa yang terkandung dalam <sup>23</sup> tanaman dapat terekstrak sempurna. Hasil maserasi disaring dengan *Buchner* untuk memisahkan filtrat dari ampas serbuk biji buah merah. Filtrat berwarna coklat kekuningan dipekatkan dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dan didapatkan cairan agak kental berwarna coklat kehitaman sebanyak 4,775 g dengan rendemen 10,61%.

Proses identifikasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak PE dan ekstrak etanol dilakukan dengan skrining fitokimia. Skrining

fitokimia merupakan identifikasi awal yang membantu memberikan gambaran golongan senyawa yang terkandung dalam biji buah merah.

### **C. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dengan Skrining Fitokimia**

Golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak PE dan etanol diidentifikasi dengan uji warna menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing. Skrining fitokimia dilakukan dengan uji tabung dan uji penegasan dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Uji penegasan dengan KLT hanya dilakukan pada senyawa metabolit sekunder yang memberikan hasil positif pada uji tabung karena adanya *false positive result* yang akan menyebabkan munculnya keragu-raguan pada hasil skrining fitokimia. Skrining fitokimia dapat dilakukan berdasarkan penelusuran pustaka atau penelitian berkaitan yang telah dilakukan sebelumnya.

Ekstrak petroleum eter mengandung senyawa yang bersifat non polar karena petroleum eter merupakan pelarut non polar, sehingga PE hanya mengisolasi senyawa-senyawa non polar. Ekstrak PE mengandung senyawa yang larut dalam lemak, antara lain ; lemak dan asam lemak tinggi, steroid, triterpenoid, dan karotenoid.

Ekstrak etanol mengandung senyawa yang bersifat polar, antara lain; alkaloid, glikosida, tanin, dan saponin. Skrining fitokimia terhadap alkaloid dalam biji buah merah tidak dilakukan karena menurut Moeldjopawiro (2005), sari buah merah tidak mengandung alkaloid.

Skrining fitokimia yang dilakukan terhadap masing-masing hasil ekstraksi sebagai berikut ;

#### **1. Skrining Fitokimia Ekstrak Petroleum Eter (PE) Biji Buah Merah**

Uji kandungan senyawa ekstrak PE biji buah merah mengacu pada penelitian Budi (2005), yang telah menyatakan sebelumnya bahwa lemak dan asam lemak tinggi, steroid, triterpenoid, dan karotenoid terkandung dalam sari



buah merah. Hasil skrining fitokimia (uji tabung) ekstrak PE dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Skrining Fitokimia (Uji Tabung) Ekstrak PE Biji Buah Merah.

No.	Kandungan Senyawa	Pereaksi Uji	Hasil	Kesimpulan
1.	Lemak dan Asam Lemak	-	Sisa berminyak	+
2.	Steroid dan Triterpenoid	<i>Lieberman-Burchard</i>	Terbentuk cincin merah kecoklatan antara dua lapisan. Lapisan atas berwarna hijau dan lapisan bawah berwarna coklat-merah	+
3.	Karotenoid	SbCl <sub>3</sub> dalam Kloroform	Terbentuk warna merah jingga	+

Keterangan : (+) = Ada golongan senyawa kimia

(-) = Tidak ada golongan senyawa kimia

Uji tabung terhadap lemak dan asam lemak dilakukan dengan menambahkan KOH dalam etanol, penambahan KOH dalam etanol akan menyebabkan ikatan ester dalam trigliserida mengalami hidrolisis menjadi asam lemak bebas dan gliserol, proses tersebut kemudian dilanjutkan dengan menambahkan air panas (saponifikasi). Asam lemak diekstraksi dengan dietil eter. Jika fraksi dietil eter diuapkan meninggalkan sisa yang berminyak, maka hal ini menunjukkan bahwa dalam ekstrak PE positif mengandung asam lemak (Tabel 4). Fraksi dietil eter dari pengujian asam lemak di atas juga digunakan untuk identifikasi steroid, triterpenoid dan karotenoid. Identifikasi asam lemak selanjutnya dilakukan dengan uji penegasan KLT.

Ekstrak dietil eter yang telah diuapkan pelarutnya ditambahkan anhidrida asam asetat dan kloroform. Anhidrida asam asetat berfungsi untuk memisahkan jenis-jenis senyawa steroid. Awalnya setelah penambahan kloroform, larutan berwarna kekuningan namun setelah ditambah dengan 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, terbentuk dua lapisan warna yang berbeda. Lapisan atas berwarna hijau dan batas antara dua larutan tersebut terbentuk cincin merah kecoklatan. Hal ini

menunjukkan bahwa dalam ekstrak PE terdapat steroid dan triterpenoid. Pereaksi *Lieberman-Burhard* yang digunakan tidak hanya memberikan reaksi yang spesifik terhadap adanya steroid dan triterpenoid tetapi juga pada senyawa glikosida steroid. Warna hijau yang terbentuk setelah penambahan  $H_2SO_4$  pekat menunjukkan adanya glikosida jantung.

Reaksi antara steroid tak jenuh atau triterpenoid dengan pereaksi *Lieberman-burchard* akan menyebabkan terbentuknya warna yang spesifik sesuai dengan senyawa yang berikatan dengan asam. Senyawa golongan triterpenoid ditandai dengan timbulnya warna merah sedangkan senyawa golongan steroid ditandai oleh terbentuknya warna hijau. Identifikasi dilanjutkan dengan uji penegasan dengan KLT.

Karotenoid merupakan suatu senyawa tetraterpenoid yang memiliki pigmen warna kuning hingga merah. Karotenoid dalam ekstrak PE diidentifikasi dengan pereaksi  $SbCl_3$  dalam kloroform (pereaksi *Carr Price*). Terbentuknya warna merah jingga setelah penambahan  $SbCl_3$  menunjukkan bahwa dalam ekstrak PE terdapat karotenoid. Terbentuknya warna ini disebabkan karotenoid membentuk kompleks dengan ion logam Sb.

## 2. Skrining fitokimia Ekstrak Etanol Biji Buah Merah

Ekstrak etanol mengandung senyawa yang bersifat polar, antara lain ; alkaloid, glikosida, tanin, saponin dan antrakuinon. Hasil skrining fitokimia (uji tabung) ekstrak etanol biji buah merah dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Skrining Fitokimia (Uji Tabung) Ekstrak Etanol Biji Buah Merah.

No.	Kandungan Senyawa	Pereaksi Uji	Hasil	Kesimpulan
1.	Saponin	-	Tidak terbentuk buih	-
2.	Tanin	$FeCl_3$	Larutan warna hijau kehitaman	+

3.	Glikosida			
	a. Fenol	$K_4Fe[CN]_3$ dan $FeCl_3$	Larutan biru- hijau kehitaman	+
	b. Flavonoid aglikon	Logam Mg dan HCl	Tidak terjadi perubahan	-
	c. Antrakuinon	NaOH	Larutan merah jingga	+
	d. Asam Lemak	-	Sisa berminyak	+

Keterangan : (+) = Ada golongan senyawa kimia (-) = Tidak ada golongan senyawa kimia

Saponin merupakan glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air jika diaduk. Uji saponin dilakukan berdasarkan uji *Forth* yaitu dengan menambahkan akuades ke dalam ekstrak etanol lalu dikocok dengan *Vortex*, jika dalam ekstrak etanol biji buah merah mengandung saponin maka setelah pengocokkan akan terbentuk buih (Rusdi, 1990). Hasil uji tabung terhadap saponin menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji buah merah tidak mengandung saponin.

Pengujian ada tidaknya tanin dalam ekstrak etanol dilakukan dengan pereaksi  $FeCl_3$ . Setelah penambahan  $FeCl_3$  warna larutan menjadi hijau kehitaman. Terbentuknya warna hijau kehitaman disebabkan karena tanin membentuk kompleks dengan ion  $Fe^{3+}$ . Tanin galat akan memberikan warna biru kehitaman sedangkan tanin katekol akan memberikan warna hijau-kehitaman setelah penambahan  $FeCl_3$ . Sehingga jenis tanin yang terkandung dalam ekstrak etanol adalah tanin katekol.

Senyawa glikosida adalah senyawa yang tidak mereduksi, yang bila terhidrolisis akan menghasilkan gugus aglikon (bagian yang bukan gula) dan molekul gula. Glikosida pada umumnya larut dalam air atau pelarut polar yaitu etanol sedangkan aglikonnya tidak larut dalam air. Ekstrak etanol dihidrolisis dengan HCl 10%. Reaksi hidrolisis tersebut akan menyebabkan pemecahan glikosida menjadi aglikon dan gula. Kemudian diekstraksi dengan eter. Fraksi eter kemudian ditambah dengan  $Na_2SO_4$  anhidrat untuk menghilangkan air yang terserap oleh eter. Fraksi eter ini digunakan untuk pengujian senyawa fenol, aglikon flavonoid, dan glikosida antrakinon.

Senyawa-senyawa fenol memberikan warna yang karakteristik setelah penambahan campuran kalium heksasianoferrat (III) dan  $\text{FeCl}_3$  ke dalam fraksi eter. Munculnya warna biru-hijau kehitaman setelah penambahan  $\text{FeCl}_3$  menunjukkan adanya senyawa fenol (Tabel 5). Hasil ini menunjukkan bahwa dalam ekstrak etanol terkandung senyawa fenol. Perubahan warna yang terjadi setelah penambahan  $\text{FeCl}_3$  dimungkinkan karena terbentuknya kompleks  $\text{Fe}^{3+}$ -fenol.

Uji flavonoid dengan menggunakan logam Mg dan HCl sebagai pereaksi spesifik tidak memberikan perubahan warna. Jika dalam ekstrak etanol biji buah Merah terdapat flavonoid aglikon maka setelah penambahan logam Mg dan HCl akan terbentuk garam flavilium berwarna merah. Jadi, ekstrak etanol tidak mengandung aglikon flavonoid.

Fraksi eter ditambah dengan NaOH 10% (pereaksi *Borntrager*) untuk mengetahui adanya glikosida antrakuinon dalam ekstrak etanol. Uji *Borntrager* digunakan untuk mendeteksi adanya antrakuinon yang terikat dalam glikosidanya. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi merah jingga setelah penambahan NaOH karena antrakuinon akan memberikan karakteristik warna merah, violet, hijau, atau ungu dengan basa. (Sirait, 1987).

Fraksi eter yang diperoleh dari pengujian glikosida juga digunakan untuk mengetahui adanya asam lemak dalam ekstrak etanol. Fraksi eter diuapkan kemudian terlihat bahwa sisa eter tersebut berminyak, maka dalam ekstrak etanol juga mengandung asam lemak.

Golongan senyawa yang memberikan hasil positif pada uji tabung kemudian di KLT untuk uji penegasan. Hasil skrining menunjukkan bahwa biji buah merah mengandung senyawa lemak dan asam lemak tinggi; steroid dan triterpenoid; karotenoid; tanin dan senyawa fenol; antrakuinon. Asam lemak tidak hanya teridentifikasi dalam ekstrak PE tetapi juga dalam ekstrak etanol.

### 3. Uji Penegasan Skrining Fitokimia dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji penegasan skrining fitokimia dengan KLT dilakukan untuk lebih menegaskan hasil yang diperoleh dalam uji tabung skrining fitokimia. Uji

penegasan dengan KLT hanya dilakukan untuk golongan-golongan senyawa yang memberikan hasil positif pada uji sebelumnya (asam lemak; steroid dan triterpenoid; karotenoid; antrakuinon; tanin dan senyawa fenol). Hasil uji penegasan dengan KLT dari ekstrak PE dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Penegasan dengan KLT Ekstrak PE dari Biji Buah Merah

Kandungan Senyawa	Hasil Uji Penegasan KLT				Kesimpulan
	R <sub>f</sub>	UV <sub>254 nm</sub>	UV <sub>365 nm</sub>	Teori	
Asam lemak	0,8; 0,642; 0,467	-	3 Spot ungu dalam latar merah muda	Ungu	+
Steroid dan triterpenoid	0,95	Hitam kebiruan	Ungu	Ungu	+
Karotenoid	0,942	Hitam kebiruan	Ungu	Ungu	+

Keterangan : (+) = Ada golongan senyawa kimia (-) = Tidak ada golongan senyawa kimia

Hasil uji KLT terhadap ekstrak PE menegaskan bahwa asam lemak, steroid, triterpenoid, dan karotenoid terkandung dalam biji buah merah. Karotenoid dan asam lemak merupakan kandungan senyawa yang juga teridentifikasi dalam sari buah merah. (Budi, 2001). Hasil KLT terhadap asam lemak menunjukkan adanya 3 spot sedangkan steroid-triterpenoid dan karotenoid masing-masing 1 spot. Hal ini mengindikasikan bahwa kandungan asam lemak relatif lebih tinggi jika dibandingkan dengan senyawa yang lain dalam ekstrak PE biji buah merah.

Berdasarkan harga R<sub>f</sub> dan sifat kepolaran senyawa, asam lemak bersifat lebih polar jika dibandingkan karotenoid, steroid dan triterpenoid. Selanjutnya perbedaan sifat kepolaran senyawa menjadi dasar prinsip pemisahan senyawa atau fraksinasi dari ekstrak PE biji buah merah.

Uji penegasan dengan KLT ekstrak etanol dilakukan terhadap senyawa antrakuinon; tanin; dan senyawa fenol. Hasil uji penegasan ekstrak etanol dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji Penegasan dengan KLT Ekstrak Etanol Biji Buah Merah

Kandungan Senyawa	Hasil Uji Penegasan KLT					Kesimpulan
	R <sub>f</sub>	Sinar tampak	Teori	UV <sub>365 nm</sub>	Teori	
Antrakuinon	0,942	Merah jingga	Merah	Kuning kehijauan	Kuning	+
Tanin dan senyawa fenolik	0,958 0,525	Hijau-kuning Merah coklat	Hijau-kuning Merah	Hijau-kuning Merah coklat	Hijau	+

Keterangan : (+) = Ada golongan senyawa kimia (-) = Tidak ada golongan senyawa kimia

Hasil uji penegasan ekstrak etanol biji buah merah (Tabel 7) menegaskan bahwa dalam ekstrak etanol biji buah merah mengandung antrakuinon, tanin dan senyawa fenol.

Menurut Budi (2005), komponen utama dari sari buah merah adalah asam lemak. Hasil uji penegasan dengan KLT menunjukkan profil spot asam lemak lebih dominan dari profil spot senyawa lainnya yang juga teridentifikasi dalam ekstrak PE dan etanol. Hal ini memberikan suatu gambaran bahwa asam lemak mungkin merupakan komponen utama yang terkandung dalam biji buah merah. Dengan demikian perlu dilakukan proses fraksinasi dengan kromatografi kolom untuk memisahkan asam lemak dari komponen senyawa lain yang juga terkandung dalam ekstrak PE (steroid dan triterpenoid; karotenoid). Fraksinasi ekstrak PE biji buah merah dilakukan dengan KCV.

#### **D. Pemisahan Komponen Senyawa dalam Ekstrak Petroleum Eter (PE)**

Pemisahan komponen-komponen senyawa yang terkandung dalam ekstrak PE (lemak dan asam lemak tinggi; steroid dan triterpenoid; dan karotenoid) dilakukan dengan metode kromatografi cair vakum (KCV). Pemilihan KCV karena senyawa yang akan dipisahkan merupakan komponen utama yang jumlahnya relatif banyak. KCV memiliki kelebihan dalam efisiensi waktu. Langkah awal dari pemisahan komponen ekstrak PE adalah penentuan eluen yang akan digunakan dalam KCV. Penentuan sistem eluen ini dilakukan dengan KLT.

Eluen terpilih yaitu yang menghasilkan spot paling banyak dan memberikan profil pemisahan yang baik.

#### 1. Penentuan Sistem Eluen dengan KLT

Penentuan sistem eluen dengan KLT bertujuan untuk mencari sistem eluen yang mampu memberikan pemisahan yang paling baik dan sekaligus untuk mengetahui profil pemisahannya. Profil pemisahan memberikan informasi mengenai kompleksitas senyawa yang akan dipisahkan. Jika campuran senyawa yang dipisahkan sederhana maka eluen dalam KLT dapat digunakan sebagai eluen dalam kromatografi kolom (metode isokratik). Penentuan sistem eluen dengan KLT dilakukan dengan metode *trial and error*. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana dan etil asetat yang divariasi tingkat kepolarannya dengan memvariasi perbandingan volume hingga diperoleh perbandingan volume yang memberikan pemisahan paling baik. Campuran pelarut *n*-heksana dan etil asetat merupakan sistem eluen universal yang sering direkomendasikan sebagai fase gerak dalam kromatografi karena mudah diuapkan dan mudah mengatur tingkat kepolaran eluen.

Sampel ekstrak petroleum eter ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi dengan berbagai variasi perbandingan *n*-heksana : etil asetat (v/v). Variasi terdiri dari perbandingan *n*-heksana 100%, etil asetat 100%, *n*-heksana-etil asetat (1:1; 10:9; 10:8; 10:7; 10:6 ; 10:5; 10:4; 10:3; 10:2; 10:1). Spot hasil elusi dilihat dalam lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm.

Hasil pemisahan dengan perbandingan pelarut 10:3 menunjukkan adanya 2 spot berwarna ungu (dalam UV 365 nm). Spot 1 memiliki  $R_f$  0,983 dan spot 2 dengan  $R_f$  0,908. Jika eluen ini diaplikasikan sebagai fase gerak dalam kromatografi kolom maka kemungkinan dua spot tersebut sulit dipisahkan dengan baik karena jarak antar kedua spot terlalu dekat ( $\Delta R_f$  0,075) sehingga keduanya akan terelusi bersamaan.

Menurut Still (1978), pemilihan sistem eluen dengan KLT sebaiknya harus memiliki  $\Delta R_f$  0,15-0,20. Dengan demikian, untuk memperbesar harga  $\Delta R_f$  maka sistem eluen dibuat lebih non polar dari 10:3. Hasil KLT dengan perbandingan

eluen 10:1 memberikan profil pemisahan yang paling baik, dengan karakteristik warna yang relatif sama dengan sistem eluen sebelumnya (jika dilihat di bawah UV 365 nm). Spot 1 memiliki  $R_f$  0,942 dan spot 2 memiliki  $R_f$  0,775 sehingga harga  $\Delta R_f$  0,167.  $\Delta R_f$  yang cukup besar tersebut memungkinkan untuk melakukan pemisahan dengan KCV. Jika eluen 10:1 diaplikasikan dalam KCV, spot 1 akan terelusi bersama dengan eluen sedangkan spot 2 yang bersifat lebih polar akan tertinggal dalam fase diam. Untuk mengelusi spot 2 diperlukan eluen yang lebih polar yaitu *n*-heksana-etil asetat dengan perbandingan 1:1 (v/v).

Profil KLT dengan eluen *n*-heksana-etil asetat 10:1 menunjukkan bahwa campuran senyawa dalam ekstrak PE biji buah merah setidaknya terdiri dari 2 senyawa. Campuran senyawa dalam ekstrak PE sederhana dengan demikian dapat digunakan elusi isokratik dalam KCV. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana-etil asetat dengan perbandingan 10:1 dan 1:1 (v/v).

## 2. Pemisahan Komponen utama dari Ekstrak Petroleum Eter dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Kromatografi cair vakum merupakan kromatografi kolom yang dimodifikasi dengan pompa vakum untuk mempercepat proses elusi. Pengisian kolom pada KCV secara *packing* kering dimana adsorben dimasukkan ke dalam kolom tanpa dicampur terlebih dulu dengan solven. Jumlah adsorben yang digunakan tergantung pada tingkat kesulitan pemisahan serta jumlah sampel yang akan dipisahkan. Untuk pemisahan campuran yang sederhana, dapat digunakan rasio perbandingan 30 : 1. (Still, 1978). Setelah 30 g silika gel 60 (adsorben) dimasukkan, kolom divakum untuk memperoleh kerapatan adsorben maksimum. Ekstrak pekat petroleum eter yang telah diimpregnasi dengan 3 g silika gel 60 dimasukkan di atas permukaan adsorben dan dipadatkan dengan cara divakum. Impregnasi dilakukan dengan cara mencampur adsorben dengan ekstrak PE dan menguapkan pelarutnya dengan *waterbath*.

Proses elusi dilakukan dengan menggunakan 2 sistem eluen yaitu *n*-heksana-etil asetat 10:1 dan 1:1 (v/v) sehingga diperoleh 2 fraksi. Elusi dimulai dari eluen *n*-heksana: etil asetat (10:1) dan terakhir *n*-heksana: etil asetat (1:1)



dengan volume solven tiap elusi adalah 50 mL. Pengelusan dibantu dengan pompa vakum untuk mempercepat turunnya eluen.

Elusi pertama dengan solven *n*-heksana: etil asetat (10:1) menghasilkan fraksi 1 berwarna bening kekuningan. Setelah fraksi 1 diuapkan pelarutnya diperoleh fraksi berwarna merah jingga dengan jumlah yang sangat sedikit. Steroid dan triterpenoid merupakan senyawa yang lebih non polar daripada karotenoid dan asam lemak. Jika dilihat dari sifat kepolaran senyawa dan berdasarkan prinsip *like dissolve like* tidak menutup kemungkinan steroid dan triterpenoid dan atau karotenoid dapat ditemukan dalam fraksi 1.

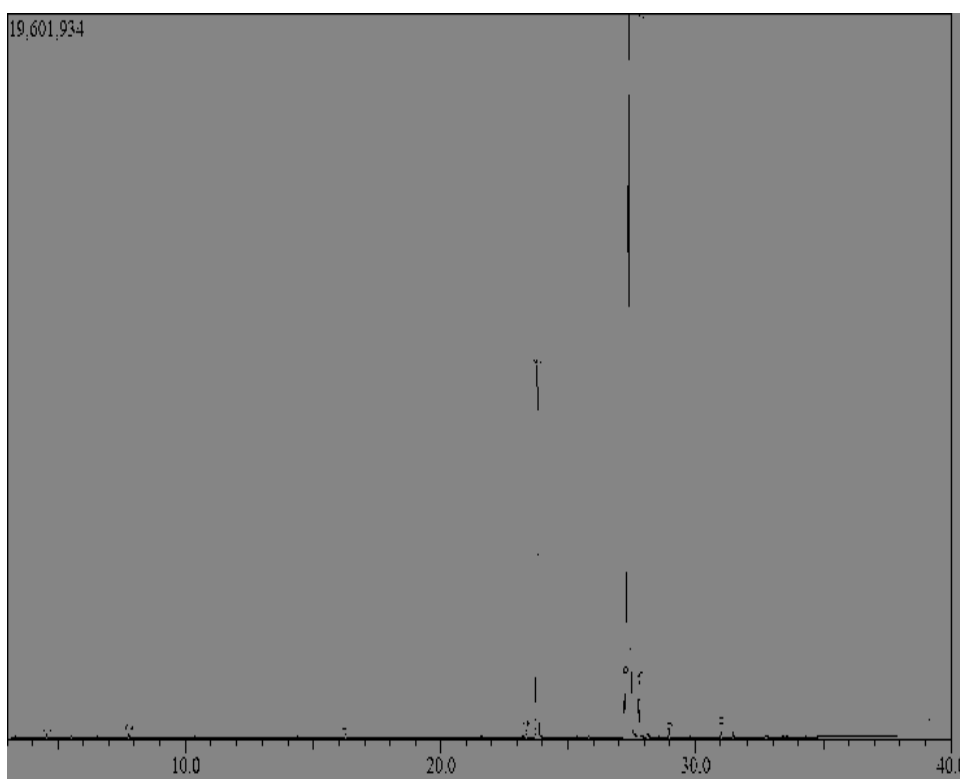
Fraksi 2 yang diperoleh dari elusi *n*-heksana: etil asetat (1:1) berwarna kuning kecoklatan. Setelah diuapkan pelarutnya diperoleh padatan putih dengan berat 0,764 g yang secara kuantitatif lebih banyak jika dibandingkan dengan fraksi 1. Pada profil pemisahan KLT dengan eluen *n*-heksana-etil asetat (10:1) menghasilkan 2 spot. Untuk mengetahui apakah kedua spot tersebut telah terpisah setelah di-KCV maka fraksi 2 di-KLT dengan fase gerak *n*-heksana: etil asetat (1:1). Hasil KLT menunjukkan adanya 1 spot berwarna ungu. Hal ini menunjukkan bahwa KCV telah memisahkan komponen senyawa yang terkandung dalam ekstrak PE. Hasil KLT terhadap fraksi 2 dapat dilihat pada Lampiran 3. Fraksi 2 kemudian diidentifikasi menggunakan KLT dengan fase gerak benzene-dietil eter (19:1) dan dideteksi dengan lampu UV 365 nm dan 254 nm. Sistem KLT tersebut analog dengan sistem KLT untuk uji penegasan asam lemak karena kemungkinan besar fraksi 2 mengandung asam lemak. Hasil deteksi di bawah lampu UV 365 nm menunjukkan 3 spot berwarna ungu dengan  $R_f$  (1) 0,933; (2) 0,808; (3) 0,542. Hasil KLT ditunjukkan di Lampiran 3.B. Fraksi 2 kemudian dianalisis dengan GC-MS untuk mengetahui komponen-komponen senyawanya. Fraksi 2 untuk selanjutnya disebut sebagai fraksi asam lemak.

#### **E. Identifikasi Komponen Senyawa Fraksi Asam Lemak dengan GC-MS**

Data GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectroscopy*) digunakan untuk menganalisis komponen senyawa yang terkandung dalam fraksi asam lemak dari ekstrak PE biji buah merah. Sebelum dilakukan analisis dengan GC-MS, fraksi 2 yang sebelumnya teridentifikasi dengan KLT mengandung asam lemak

diesterifikasi menjadi derivatnya yaitu senyawa metil ester. Hal ini dilakukan karena asam lemak mempunyai titik didih yang relatif tinggi sehingga sulit untuk dipisahkan dalam pengoperasian GC-MS. Esterifikasi dilakukan dengan mereaksikan fraksi asam lemak dengan  $\text{BF}_3$ -metanol. Hasil esterifikasi yang berupa metil ester tersebut kemudian diinjeksikan dalam GC-MS.

Kromatogram hasil pemisahan fraksi asam lemak dengan GC-MS (spesifikasi alat dan kondisi pengoperasian tercantum dalam Lampiran 1) ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Kromatogram GC-MS Fraksi Asam Lemak Ekstrak PE Biji Buah Merah

Profil kromatogram GC-MS fraksi asam lemak dari ekstrak PE biji buah merah menunjukkan adanya 11 puncak kromatogram yang terpisah dengan baik. Puncak-puncak tersebut merefleksikan banyaknya komponen senyawa yang terdapat dalam fraksi asam lemak ekstrak PE. Puncak 1; 2; 3; 4; 9; 10; dan 11 memiliki luas puncak kromatogram yang sangat kecil sehingga dapat kita abaikan dengan anggapan bahwa konsentrasi komponen senyawa tersebut dalam fraksi

asam lemak relatif sangat kecil. Hasil analisis kromatogram GC-MS ditunjukkan pada tabel 8.

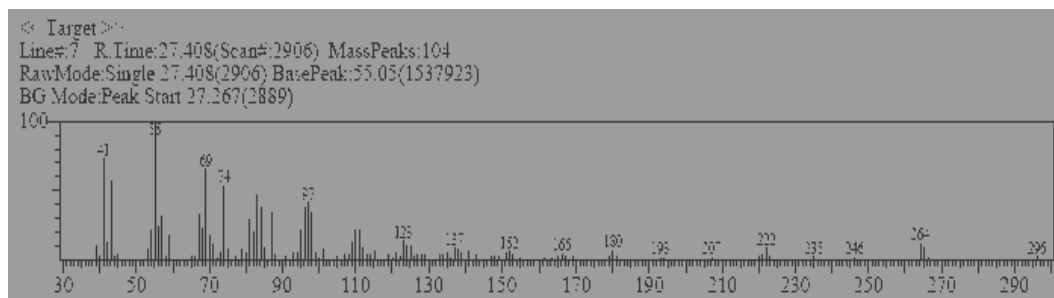
Tabel 8. Data Kromatogram GC-MS Fraksi Asam Lemak dari Ekstrak PE Biji Buah Merah

Puncak	t <sub>R</sub> (menit)	% area relatif
1	4,65	0,14
2	7,79	0,26
3	16,26	0,23
4	23,35	0,41
<b>5</b>	<b>23,80</b>	<b>23,36</b>
<b>6</b>	<b>27,21</b>	<b>4,12</b>
<b>7</b>	<b>27,40</b>	<b>67,46</b>
<b>8</b>	<b>27,79</b>	<b>3,15</b>
9	28,97	0,42
10	31,02	0,23
11	31,45	0,23

Luas area puncak kromatogram GC-MS menunjukkan konsentrasi relatif senyawa terhadap cuplikan yang teruapkan dalam pengoperasian GC-MS. Komponen utama dari fraksi asam lemak dibatasi hanya pada puncak yang memiliki prosentase luas area relatif diatas 1%. Sehingga puncak kromatogram yang memiliki % area relatif di bawah 1% dapat kita abaikan. Komponen utama biji buah merah ditunjukkan oleh puncak **5**; **6**; **7**; dan **8**.

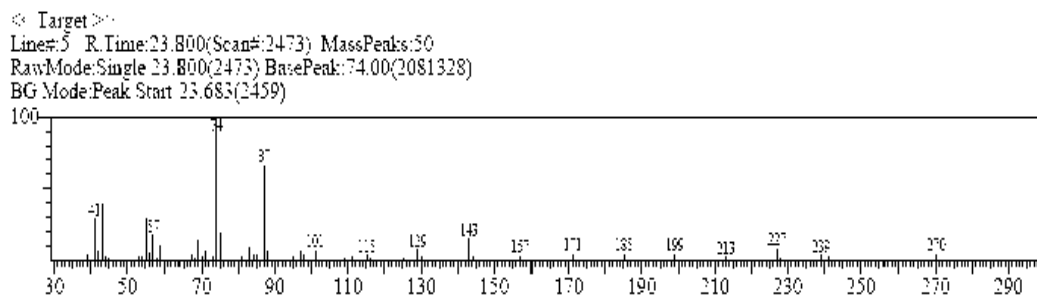
Identifikasi senyawa dilakukan dengan membandingkan pola fragmentasi spektra massa dengan pola fragmentasi senyawa *reference*. Senyawa yang dipilih adalah senyawa hasil penelusuran pustaka yang memiliki SI (*Similarity Index*) lebih besar sama dengan 90 dan mempertimbangkan kesesuaian senyawa tersebut dengan komposisi serta sifat sampel asal. Sehingga hasil senyawa yang kemungkinan sifatnya tidak sesuai dengan sampel asal dapat kita abaikan.

Puncak **7** dengan t<sub>R</sub> 27,40 menit dan prosentase luas area puncak relatif 67,46% memiliki spektra massa seperti pada Gambar 3. Puncak **7** diidentifikasi sebagai metil oleat dengan SI 96.



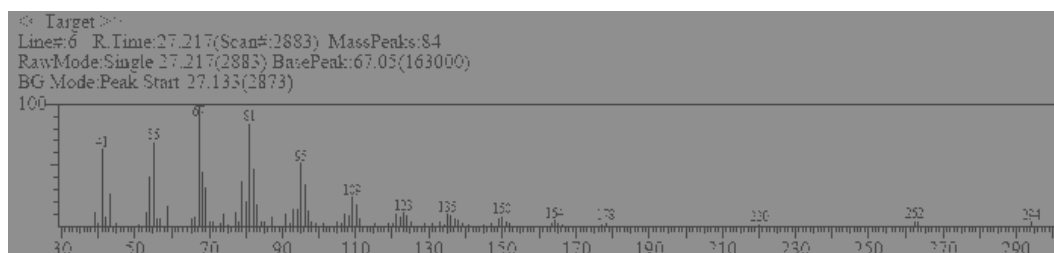
Gambar 3. Spektra Massa Senyawa 7 (Metil Oleat )

Puncak 5 dengan  $t_R$  23,80 menit dan prosentase luas area puncak relatif 23,36% diperoleh spektra massa pada Gambar 4. Berdasarkan penelusuran *library* pola fragmentasi puncak 5 memiliki indeks kemiripan 97 dengan spektra massa dari senyawa metil palmitat (metil heksadekanoat).



Gambar 4. Spektra Massa Senyawa 5 (Metil Palmitat)

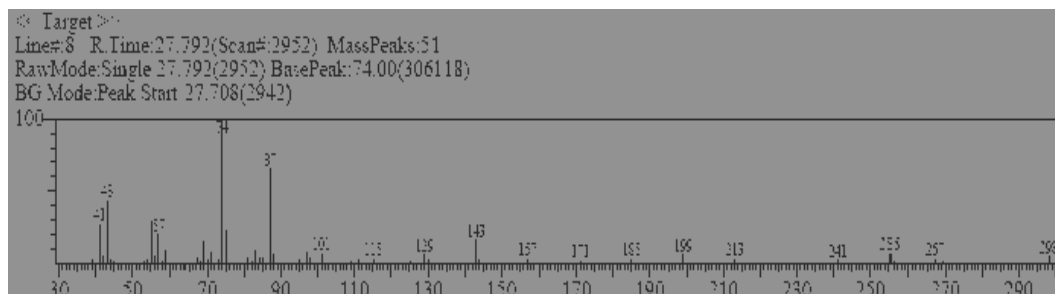
Puncak 6 dengan  $t_R$  27,21 menit dan prosentase luas area puncak relatif 3,15% memiliki spektra massa seperti pada Gambar 6. Berdasarkan pola fragmentasi spektra massa puncak 6 memiliki pola fragmentasi yang mirip dengan pola fragmentasi senyawa metil linoleat dengan SI 97. Spektra senyawa 6 ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Spektra Massa Senyawa 6 (Metil Linoleat)

Puncak 8 dengan  $t_R$  27,78 menit dan prosentase luas area puncak relatif 3,15% memiliki spektra massa seperti pada Gambar 5. Berdasarkan penelusuran *library*, spektra massa metil stearat (metil oktadekanoat) memiliki indeks

kemiripan 97 dengan spektra massa puncak 8. Spektra massa senyawa 8 dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Spektra Massa Senyawa 8 (Metil Stearat)

Prosentase area relatif dari puncak-puncak kromatogram (Tabel 8) selanjutnya digunakan untuk memperkirakan kandungan relatif masing-masing komponen asam lemak. Kandungan asam lemak total dalam biji buah merah lebih kurang 76,4% berdasarkan hasil pemisahan dengan KCV sedangkan kandungan asam lemak dalam sari buah merah berkisar 64,06%. Perkiraan komposisi senyawa (asam oleat, asam palmitat, asam linoleat, dan asam stearat) dalam ekstrak PE diperoleh dengan mengalikan prosentase area relatifnya dengan kandungan asam lemak totalnya. Prosentase relatif massa komponen asam lemak dalam biji buah merah dan prosentase massa komponen asam lemak yang diambil dari sari buah merah dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Perbandingan Komposisi Asam Lemak Utama dalam Biji Buah Merah dengan Asam Lemak dalam Sari Buah Merah (Pohan, 2006).

Asam Lemak	Prosentase Berat Asam Lemak dalam Biji Buah Merah	Prosentase Berat Asam Lemak dalam Sari Buah Merah
Asam oleat	51,53	40,90
Asam palmitat	17,84	15,90
Asam linoleat	3,15	5,26
Asam stearat	2,40	2,00
Asam lemak lain	< 1,5	< 1,5

Hasil GC-MS fraksi asam lemak ekstrak PE biji buah merah membuktikan bahwa komponen utama biji buah merah ternyata sama dengan sari buah merah yang diambil dari daging buahnya. Walaupun demikian prosentase kandungan

asam lemak dalam biji buah merah berbeda dengan yang terkandung dalam sari buah merah. Tabel 9 menunjukkan bahwa kandungan asam lemak dalam biji buah merah lebih tinggi dibanding dengan daging buahnya. Hal ini dikarenakan biji merupakan tempat penyimpanan cadangan makanan pada tanaman. Selain itu sebagian besar sintesis asam lemak pada tumbuhan terjadi dalam biji. (Estiti,1995).

Kandungan asam lemak tak jenuh dan asam lemak jenuh dalam biji buah merah relatif lebih tinggi dibandingkan dengan sari buah merahnya. Kandungan asam lemak tak jenuh (asam oleat dan asam linoleat) dalam biji buah merah yaitu 54,68% sedangkan asam lemak jenuhnya (asam palmitat dan asam stearat) lebih kurang 20,24%.

Beberapa penelitian mengindikasikan bahwa asam lemak yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat berperan sebagai senyawa aktif terhadap kanker. Sari buah merah yang beredar di masyarakat telah terbukti secara *in vivo* aktif terhadap beberapa jenis kanker. Dengan kandungan total asam lemak yang lebih tinggi, biji buah merah juga berpotensi untuk diteliti lebih lanjut.

Dari penelitian ini, diketahui bahwa komponen-komponen asam lemak dalam biji buah merah memungkinkan untuk dipisahkan. Hal ini ditegaskan oleh hasil kromatogram GC-MS fraksi asam lemak yang menunjukkan bahwa antara asam lemak tak jenuh dan asam lemak jenuh dapat terpisah dengan baik. Namun untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Penelitian yang dilakukan oleh Rina agustina (2008) berhasil memisahkan komponen asam lemak dari sari buah merah dalam senyawa turunannya dengan memodifikasi teknik KLT.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **A. Kesimpulan**

Dari hasil penelitian dengan pembahasan sebelumnya dapat diambil kesimpulan bahwa ;

1. Ekstrak PE biji buah merah mengandung golongan senyawa steroid dan triterpenoid, asam lemak, dan karotenoid; sedangkan ekstrak etanol biji buah merah mengandung golongan senyawa antrakuinon, tanin, dan senyawa fenol.
2. Komponen utama biji buah merah adalah asam oleat (67,46%), asam palmitat (23,36%), asam linoleat (4,12%), dan asam stearat (3,15%).
3. Kandungan asam lemak dalam biji buah merah lebih kurang 76,40% sedangkan kandungan asam lemak dalam sari buah merah adalah 64,06%. Jadi, biji buah merah memiliki kandungan asam lemak yang lebih tinggi daripada sari buah merah.

#### B. Saran

Berdasarkan kesimpulan di atas maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai :

1. Pemisahan lebih lanjut terhadap masing-masing komponen utama biji buah merah serta perlu dilakukan uji bioaktivitas senyawa asam lemak yang terkandung dalam biji buah merah.
2. Identifikasi dan uji bioaktivitas golongan senyawa dalam fraksi 1 ekstrak PE biji buah merah.
3. Penelitian lanjut terhadap ekstrak etanol (ekstrak polar) biji buah merah serta identifikasi senyawa yang terkandung di dalam ekstrak etanol.

#### DAFTAR PUSTAKA

---

2005. Pro dan Kontra Buah Merah, Pendapat pakar dan Praktisi, Redaksi Agromedia, Jakarta. Hal: 7-12 dan 21-26.

- \_\_\_\_\_. 2007. Buah Merah Atasi Efek Rokok. *Trubus*. Volume 45.
- Bourke, R.M., 2005. *Indigenous Fruit in Papua New Guinea*. Departement of Human Geography. Research School of Pacific and Asian Studies. The Australian National University. Camberra.
- Budi, I Made. 2001. *Kajian Kandungan Zat Gizi dan Sifat Fisiko Kimia Berbagai Jenis Minyak Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk) Hasil Ekstraksi secara tradisional di Ka. Jayawijaya Irian Jaya*. Tesis. Institut Pertanian Bogor.
- Budi, I.M., dan Paimin, F.R. 2005. *Buah Merah* . Penebar Swadaya, Jakarta.
- Bramer, S.E.V., 1997. An Introduction to Mass Spectroscopy. Department of Chemistry. Widener University.
- Departemen Kesehatan RI, 1987. *Analisis Obat Tradisional*. Jilid 1. Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Duryatmo, S., Sofia, H. dan Karjono, 2005. Bukti Ilmiah Buah Merah. *Majalah Trubus*. Volume 425.
- Estiti, B.H., 1995. *Anatomi Tumbuhan Berbiji*. Penerbit ITB, Bandung. Hal. 247-255.
- Farnsworth, N.R., 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plants, *J. Pharm. Sci.* Vol 55. 225-276.
- Fasoyiro, S.B., Adegoke, G.O., and Idowu, O.O., 2006. Characterisation and Partial Purification of Ethereal Fractions of Aframomum danielli. *World Journal of Chemistry*. Vol. 1. 01-05.
- Haila, K., 1999. *Effects of Carotenoids and Carotenoid-Tocopherol Interaction on Lipid Oxidation In Vitro*. Thesis. University of Helsinki, Departement of Applied Chemistry and Microbiology.
- Hargono, D., 1997. Obat Tradisional dalam Zaman Teknologi. *Majalah Kesehatan Masyarakat*. No. 56. 3-5.
- Harborne, J.B., 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Penerbit ITB, Bandung.
- Hendrayani, 2002, *Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Rimpang Temu Mangga (Curcuma mangga Val.) dari Ekstrak Etanol*, Skripsi, Kimia FMIPA UNS, Surakarta.



- Hu, Q., Ren, S., dan Liu, S., 2007. The Optimization of Ultrasonic Wave Extraction and Vacuum Liquid Chromatography for Isolation of Destruxins. *Medwell Journals*. Vol 2 (4). 462-467.
- Huie, C.W., 2002. A Review of Modern Sample Preparation Technique for The Extraction and Analysis of Medicinal Plants. *Springer Journal*. Vol 373 .23-30.
- Karjono, 2005. Pembuatan Sari Buah Merah. Majalah *Trubus*. Volume 424.
- Kennedy, J. and Clarke W. 2004. Cultivated Landscapes of the Southwest Pacific. Resource Management in Asia-Pacific Working Paper. The Australian National University. Canberra.
- Ketaren, S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kristanti, A.N., dkk. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Jilid 1. Airlangga University Press, Surabaya.
- Koensoemardiyah, 1992. *Biosintesis Produk Alami*. IKIP Semarang Press. Terjemahan: *Biosynthesis of Natural Products*, Manito, P., 1985. John Wiley and Sons, Inggris.
- Thenawijaya, M., 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 2. Penerbit Erlangga, Bogor. Terjemahan: *Principles of Biochemistry*. Lehninger, A. L., 1982. John Hopkins University School of Medicine, Inggris.
- McNair, H.M., Bonelli, E.J., 1988. *Dasar Kromatografi Gas*. Penerbit ITB. Bandung.
- Moeljopawiro, S., Nuringtyas, T.R., Noveriza, R., dan Trisilawati, O. 2007. *Identifikasi Fraksi Bioaktif Anti Kanker Payudara dan Kanker Rahim dan Mikrobial Kontaminan pada 3 Varietas Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk.)*. Laporan Hasil Penelitian. UGM. Yogyakarta.
- Mu'nim, A., Retnosari A., Heni S., 2006. Uji Tumorigenesis Sari Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk.) Terhadap Tikus Putih Betina yang Diinduksi 7,12 Dimetilbenz(a)antrasen (DMBA). Majalah Ilmu Kefarmasian. Vol III. No 3. 153-161.
- Murray, R., D. Granner, and Victor W.D, 1995. *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran. Edisi 22. Jakarta.

- Padmawinata, K. dan I. Soediro, 1985, *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*, Penerbit ITB, Bandung. Terjemahan : *Drugs Analysis by Chromatography and Microscopy*, Stahl, E., Michigan
- Padmawinata, K., 1991, *Pengantar Kromatografi*, Edisi Ke dua, ITB Press, Bandung. Terjemahan: *Introduction to Chromatography*, Gritter, R.J.: J. M. Bobbit; A. E Schwarting, 1985, Holden Day Inc., USA.
- Padmawinata, K. dan I. Soediro., 1996, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Cetakan ke dua, Penerbit ITB, Bandung. Terjemahan: *Phytochemical Methods*, Harborne, J.B., 1984, Chapman and Hall Ltd., London.
- Peddersen, D.S and Rosenbohm, R., 2001. Dry Vacuum Chromatography. *Synthesis Journal*. Vol. 6. 2431-2434.
- Pohan., G.H., Arie, N.I., Suherman, A.H., dan Kosasih. 2006. Teknologi Ekstraksi dan Karakterisasi Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). Ringkasan Hasil Penelitian dan Pengembangan BBIA Tahun 2006. [Http://www.bbia.go.id](http://www.bbia.go.id).
- Pohan, G.H., Aprianita, N., Wijaya, H., dan Rohimah. 2006. Kajian Teknis Standar Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). Ringkasan Hasil Penelitian dan Pengembangan BBIA Tahun 2006. [Http://www.bbia.go.id](http://www.bbia.go.id).
- Poliokas, A.M., Lee, W.H and Schroepfer, Jr., 1968. Improved Separation of Sterols by Column Chromatography. *Journal of Lipid Research*. Vol. 9.
- Rubinson J.R., and Jennifer N. H., 1997. Integration of GC/MS Instrumentation into the Undergraduate Laboratory: Separation and Identification of Fatty Acids in Commercial Fats and Oil. *Journal of Chemical Education*. Vol 74.
- Rusdi, 1990, *Tetumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*. Pusat Penelitian Universitas Andalas, Padang.
- Sastrohamidjojo, H., 2005. *Kromatografi*. Liberty, Yogyakarta.
- Sirait, M., 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Subroto, A., 2007. Buah Merah Sehatkan Mata ?. *Majalah Trubus*. Jakarta, No.451. 116-117.

- Still, Clark., Kahn, M., and Mitra, A., 1978. Rapid Chromatographic Technique for Preparatives Separations with Moderate Resolution. *Journal of Organic Chemistry*. Vol. 43. No. 14.
- Styrer, L., 2000. *Biokimia volume 2*. Fourth Edition. Stanford University.
- Sylverstein, R.M., Bassler, G.C., Morril, T.C., 1991. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. Fifth Edition. John wiley & Sons. New York.
- Timotius, K.H., 2003. Komposisi Minyak Biji Mengkudu (Morinda citrifolia L.). *Jurnal Teknologi dan Pangan*, Vol. XIV, No. 3.
- Tjitrosoepomo, G., 2005, *Morfologi Tumbuhan*. Edisi ke-15. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. Hal 242.
- Tong, L., Zang L., 2007. Analysis of the Fatty Acids from *Periploca sepium* by GC-MS and GC-FID. *Asian Journal of Traditional Medicine*. Vol 2.
- Winarno, F.G., 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.